

タツナミガイ (*Dolabella auricularia*) のセルラーゼ-胃歯セルラーゼの精製と生理的意義-

著者	安齋 寛
号	330
発行年	1984
URL	http://hdl.handle.net/10097/16988

氏 名 (本籍)	あん 安	ざい 齋	ひろし 寛
学 位 の 種 類	農	学	博 士
学 位 記 番 号	農 博 第	3 3 0	号
学位授与年月日	昭和 60 年 3 月 26 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当		
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農芸化学専攻		
学 位 論 文 題 目	タツナミガイ (<u>Dolabella auricularia</u>) のセルラーゼ —胃歯セルラーゼの精製と生理的意義—		

論文審査委員 (主 査)

教授 松 田 和 雄	教授 水 野 重 樹
	助教授 菅 原 義 雄

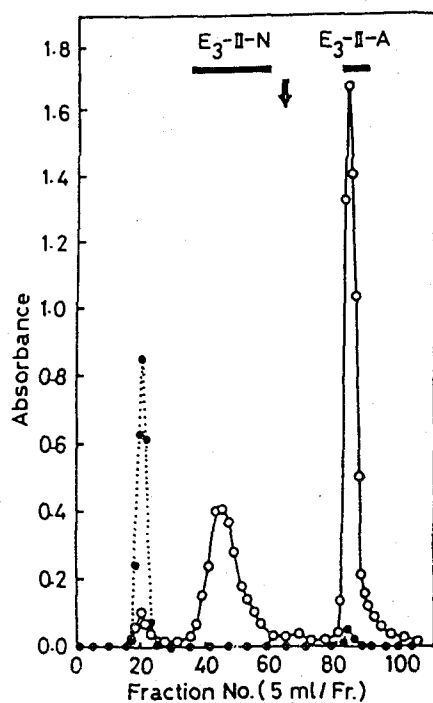


Fig. 4 Elution pattern of E_3 -II on Cellooligosaccharide-(EPOX)-Sephacrose CL-2B affinity chromatography.

●, Protein (absorbance at 595 nm); ○, CMC-saccharification activity (absorbance at 500 nm)
The arrow indicates addition of NaCl free buffer solution containing 1% cellobiosyl-sorbitol.

そこで、回収率の良いアフィニティークロマトグラフィー用吸着体を開発し、その操作条件を決定した。この新しいアフィニティークロマトグラフィーの特徴とする所は、リガンドにセロオリゴ糖 (G_3 から G_6 の混合物) を使用したことで、セルラーゼの親和性が、従来の高分子基質に比べ小さいため、良い回収率が得られた。セルラーゼは、1.0 M の塩化ナトリウム存在下で吸着され、1% Cellobiosyl-sorbitol を含む、塩化ナトリウムを除いた緩衝液によって溶出される。

$B\beta$ の精製過程で、DEAE-Toyopearl に吸着した成分 (E_3 -II) を、2.0 M の塩化ナトリウムを含む緩衝液で溶出させた後、アフィニティークロマトグラフィーに供した (Fig. 4)。

E_3 -II に含まれるセルラーゼ活性は、担体に親和性を示すが吸着しない E_3 -

Table I. Purification steps of Cellulase $B\beta$ and A.

Steps	Total protein (mg)	CMC-saccharification activity			
		Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification fold	Recovery (%)
Crude extract	166.60	589.5	3.5	1.0	100.0
Sephadex G-100(E_3)	99.75	385.0	3.9	1.1	65.3
DEAE-Toyopearl(E_3 -I)	1.84	88.6	40.1	11.3	15.0
CM-Toyopearl($B\beta$)	0.28	79.1	279.7	79.1	13.4
DEAE-Toyopearl(E_3 -II)	79.55	265.3	3.3	0.9	45.0
Affinity chromatography ^a (E_3 -II-A)	2.34	172.8	73.7	20.8	29.2
(E_3 -II-N)	-	51.8	-	-	8.8
Toyopearl HW-50F(A)	1.65	131.9	79.9	22.6	22.4

^a Cellooligosaccharide-(EPOX)-Sephacrose CL-2B

II-Nと、溶出剤を加えることによって得られるE₃-II-Aに分離した。このクロマトグラフィーにおける酵素の回収率は、84%であった。

E₃-II-Aは、さらにゲルクロマトグラフィーを用いて精製し、Fraction Aを得た。また、E₃-II-Nは、これ以上精製が困難であったため、この段階でFraction Nと名付けた。

全精製過程における回収率、精製度をTable 1に示す。

2-3 Fraction Aの多型現象

Fraction Aは、DISC-電気泳動により、7本のタンパク質バンド（移動度の小さい順に、

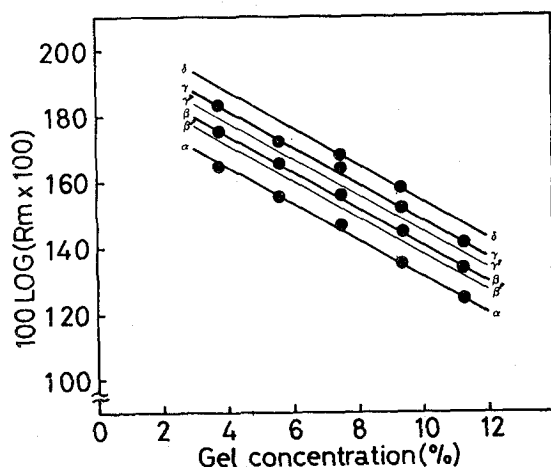


Fig. 5 Hedrick-Smith plots of Fraction A isomers

$\alpha, \beta', \beta, r', r, \delta'$ に分離された。これらの成分は、ゲル濃度を変えてDISC-電気泳動を行うHedrick-Smith法によれば、分子量が同じで電荷の異なる、電荷的多型体であることが判った (Fig. 5)。また、ハイドロキシエチルセルロースを用いたアフィニティー電気泳動法により、いずれの成分も、セルラーゼであることが確認された (Fig. 6)。

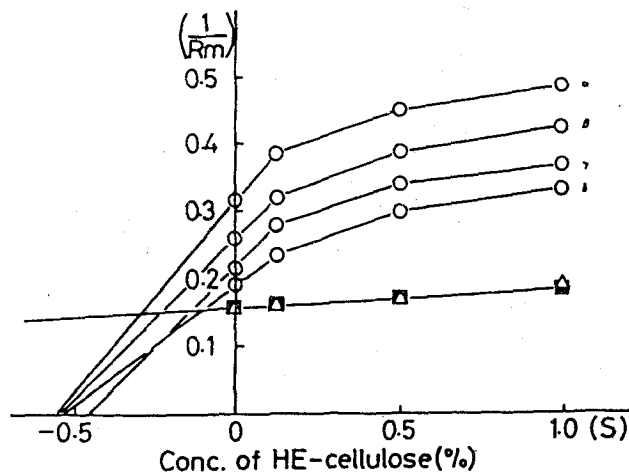


Fig. 6 Affinity plots of Fraction A isomers against HE-cellulose by affinity electrophoresis

△, BSA monomer. ■, ovalbumin.

さらに、Fraction Aに含まれるセルラーゼ群は、アフィニティークロマトグラフィーにおいて1つのピークとして挙動し、ほぼ同一の親和力を持つことを示したので、これらの点で、Fraction Aに含まれる一群のセルラーゼを、1つの酵素とみなし、セルラーゼAとして実験を進めた。

2-4 セルラーゼA及びB β の一般的性質

A及びB β の一般的性質を Table II に示した。

Table II Properties of cellululase A and B β

	A	B β
Molecular weight		
Gel filtration	31,000	18,000
SDS-PAGE	(51,000)	44,000
pI	4.5-6.0	8.6
Optimum pH	6.3	6.3
Optimum temperature	45°C	45°C
pH stability		
0°C	6.0-10.5	5.5-10.5
30°C	6.3-7.5	5.5-7.5
Thermal stability	30°C	40°C

B β の等電点 (pI 8.6) は、これまで知られているセルラーゼの内で最も塩基性であり、塩基性アミノ酸 (Lysine, Histidine, Arginine) のモル比が、従来知られている微生物セルラーゼ (4.4 ~ 6.3%) の約2倍 (10.5%) 含まれている。また、A, B β ともその至適 pH 及び pH 安定範囲は、タツナミガイ消化管内の pH と、ほぼ一致している。

A, B β , 両酵素ともに 0.1 ~ 10 μ M の N-プロモスクシンイミド処理で失活することから、酵素の

活性には、トリプトファンが関与しているものと推定された。また、p-クロロマーキュリベンゾエイドでは失活がみられなかったが、Hg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ などの金属イオンによっては失活した。しかし、賦活化因子は見い出されなかった。

第3章 基質特異性

タツナミガイの胃歯抽出液から得られた3種のセルラーゼ (A, N, B β) の基質特異性を詳しく調べた。

3-1 高分子基質に対する作用様式

タツナミガイの3種のセルラーゼは、いずれもCM-セルロース (CMC) の粘度低下のパターンから、Endo型酵素と考えられたが、各々の酵素のランダム度 (同一還元力生成に対する粘度低下度の比) は、B β が、A, N, より高く、基質の重合度による作用性の違いが推測された (Fig. 7)。そこで、同じ置換率 (\overline{DS}) を持ち、平均重合度 (\overline{DP}) の異なる2種の CMC を用い、それらに対する3種のセルラーゼの速度定数 (K_m , V_{max}) を測定した (Table III)。

K_m 値から、A と N は、低重合度の CMC に、また B β は、高重合度の CMC に親和性の高いことが示され、ランダム度の差が、少くとも、重合度の異なる基質に対する親和性の差に依存していることが証明された。

しかし、CMC はセルロース誘導体であるから、セルラーゼ作用の真のモデルとはなり難いと

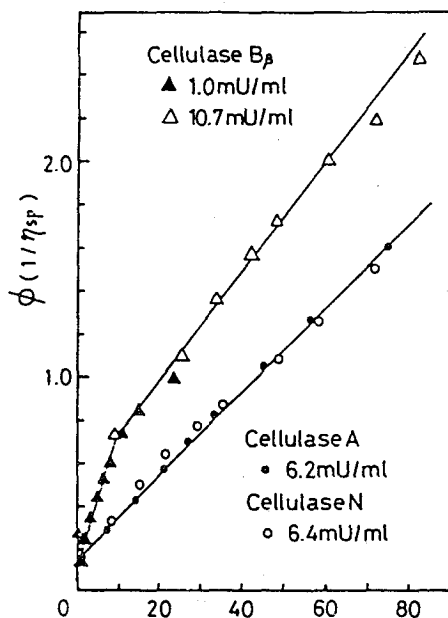


Fig. 7 Relationship between increase in fluidity and reducing sugar during the hydrolysis of CMC with Cellulase B_β , A and N.

考えられる。そこで、置換基を持たない不溶性基質ではあるが、作用され易いリン酸膨潤セルロース (swollen cellulose) を用いて、A と B_β 間の作用性の違いを解析した。

Swollen cellulose の糖化活性において、 B_β は A の約 2 倍の速度を持ち、可溶化部分の \overline{DP} も B_β が大きいことが示された (Table IV)。

HPLC を用いて可溶化部分のオリゴ糖組成を分析すると (Fig. 8), B_β は G_4 が多く、その経時変化から、 G_4 以下のオリゴ糖は、分解を受けにくいことが明らかとなった。

以上のことから、不溶性基質に対するランダム度にも違いがあると考え、その実験を行った。

Table III Kinetic constants of cellulases from gastric teeth (*Dolabella auricularia*) against CMC^a

Enzyme ^b	CMC(\overline{DP} , \overline{DS})			
	F-SH(715, 0.61)		4H(13,000, 0.61)	
	Km(μ M)	Vmax(μ M/min.)	Km(μ M)	Vmax(μ M/min.)
A	1.21	36.4	1.84	46.5
N	3.07	32.5	8.77	55.5
B_β	9.43	150.9	2.80	108.3

a, Conc. of CMC was measured by Phenol- H_2SO_4 method as glucose.

b, Final conc. of enzyme : 85mU/ml

Table IV Time course of swollen cellulose degradation with cellulase A and B β

Time (min.)	A			B β		
	Degradation rate (%)	Solubility (%)	\overline{DP} of soluble fraction	Degradation rate (%)	Solubility (%)	\overline{DP} of soluble fraction
20	0.67	1.16	2.80	1.14	2.38	4.43
45	1.12	1.70	2.31	1.48	3.18	3.42
180	2.14	3.10	2.04	2.26	4.24	2.88
360	3.13	5.02	1.88	2.65	5.03	2.70

Final conc. of enzyme : 187 mU/ml

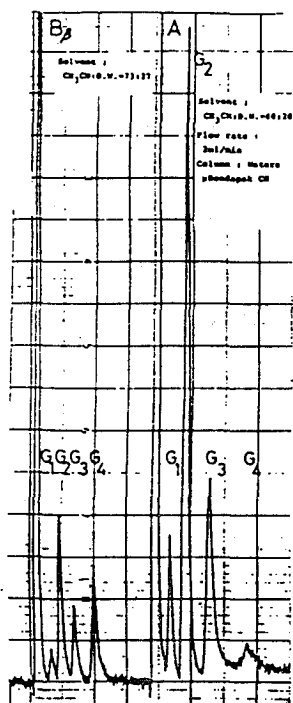


Fig. 8 High performance liquid chromatograms of hydrolysis products from swollen cellulose by B β and A

Table V Kinetic constants of various cellulases from *Dolabella* and *Irpex*^a against swollen cellulose

Enzyme ^b (type)	K _m (μ M)	V _{max} (μ M/min.)
Ex-1(exo)	2.34	17.33
A(endo)	5.72	15.58
N(endo)	18.38	7.24
B β (endo)	23.43	60.13
En-1(endo)	25.08	72.55

a, Ex-1 and En-1 from *Irpex lacuteus* were supplied by Dr.KANDA

b, Ex-1 was used 20mU/ml as swollen cellulose saccharification activity and others were used 85mU/ml as CMC-saccharification activity.

A, N, B β の swollen cellulose に対する親和性は, A, N, B β の順に小さく, さらにAは, カビの代表的 Exo 型 セルラーゼ (Ex-1) と, また, B β は Endo 型 セルラーゼ (En-1) に近い値を示した (Table V)。

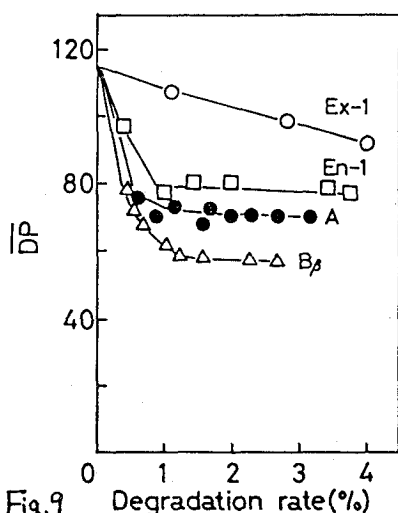


Fig.9 Decrease in the \overline{DP} of swollen cellulose and simultaneous production of reducing sugar(degradation rate) by various cellulases

さらに、不溶性部分の \overline{DP} の低下速度も、 $B\beta$ が A より大きいことが明らかとなった (Fig. 9)

これまでの結果は、タツナミガイの3種のセルラーゼの基質に対する親和性及び、ランダム度などの作用様式が、各々異なることを示しており、また、セロオリゴ糖への作用様式も異なることを強く示唆した。

3-2 セロオリゴ糖に対する作用

TABLE VI. Molar ratios of products from G_4 , G_5 and G_6 by Cellulase $B\beta$ ^a.
The ratio of cellooligosaccharide used as substrate is taken as unity.



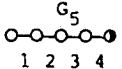
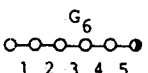
Substrate ^b	Incubation Hydrolysis		Products					
	time	extent(%)	G_1	G_2	G_3	G_4	G_5	G_6
G_4 ○—○—○—● 1 2 3 c	0	0	—	—	—	1.00	—	—
	24 h	67.2	0.35	0.71	0.36	0.26	—	—
G_5 ○—○—○—○—● 1 2 3 4	0	0	—	—	—	—	1.00	—
	60 min	68.6	0.48	0.24	0.24	0.49	0.24	—
G_6 ○—○—○—○—○—● 1 2 3 4 5	0	0	—	—	—	0.07	0.17	1.00
	2 min	46.9	—	0.60	—	0.65	0.15	0.42
	10 min	85.3	0.08	0.97	0.06	1.01	0.01	0.09

a. Enzyme concentration ; 3.1 U/ml for G_4 and G_5 , 3.2 U/ml for G_6 .

b. Substrate concentration ; 4.4 mM, 5.0 mM and 3.5 mM for G_4 , G_5 and G_6 , respectively.

c. ● ; reducing terminal residue. The numbers under molecular diagrams of substrates represent the bonds from the nonreducing end.

TABLE VII Molar ratio of products from G₃, G₄, G₅ and G₆ by Cellulase A^a.
The ratio of cellooligosaccharide used as substrate is taken as unity.

Substrate ^b	Incubation Hydrolysis		Products					
	time	extent(%)	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₅	G ₆
G ₃ 	0	0	-	-	1.00	-	-	-
c	24 h	87.9	0.88	0.89	0.11	-	-	-
G ₄ 	0	0	-	-	-	1.00	-	-
	24 h	115.5	0.45	1.63	0.03	0.05	-	-
G ₅ 	0	0	-	-	-	-	1.00	-
	60 min	128.5	0.43	1.08	0.71	0.06	0.01	-
G ₆ 	0	0	-	-	-	-	-	1.00
	2 min	108.8	0.13	0.83	0.35	0.75	-	0.03

a. Enzyme concentration ; 3.1 U/ml for G₄ and G₅, 3.2 U/ml for G₃ and G₆.

b. Substrate concentration ; 5.4 mM, 4.8 mM, 5.1 mM and 4.1 mM for G₃, G₄, G₅ and G₆, respectively.

c. ● ; reducing terminal residue. The numbers under molecular diagrams of substrates represent the bonds from the nonreducing end.

Reaction mixture(400μl, 25 mM Na-cacodylate-HCl buffer, pH 6.3) was incubated for appropriate periods at 30°C, and then reaction was stopped by boiling. Hydrolyzates were analyzed by gel filtration.

高分子基質に対する性質が対照的な、AとB β のセロオリゴ糖及びセロオリゴ糖アルジトールに対する分解様式を、Bio-gel P-2のゲルクロマトグラフィーを用いて詳細に分析した。

高分子基質に対するランダム度の違いから、AがB β より、低重合度のオリゴ糖に容易に作用すると予想されたが、事実、G₃とG₅の加水分解率は、A>B β であり、かつ分解可能なオリゴ糖の下限は、AがG₃、B β がG₄であった。(Table VI, VII)。また、オリゴ糖及びオリゴ糖アルジトールの各グルコシド結合が加水分解を受ける確率 (Fig. 10) から、AとB β のサブサイトの構造に違いがあると考えられ、特にB β のG₅、G₆の加水分解様式は、これまで知られている微生物セルラーゼの様式のいづれとも異なるものであった。

3-3 共同作用による相助効果

基質に対する作用様式の異なるAとB β を用いて、それらのCMC, Swollen cellulose, Avicelに対する糖化活性における相助効果を比較した。(Table VIII)。

相助効果は、結晶性の高い基質ほど高く、カビにおける作用様式の違ったEndo型酵素間の共同作用と同様な結果が得られた。

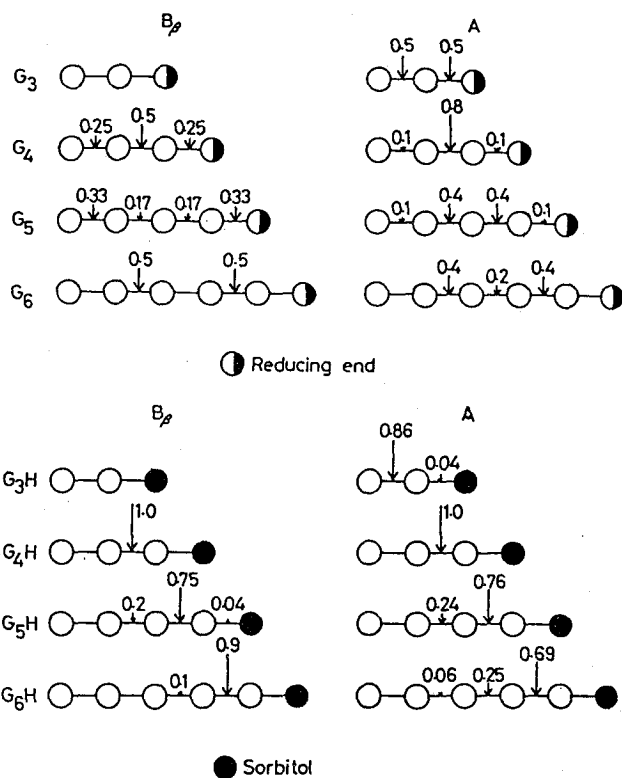


Fig. 10 The action patterns of cellulase B_β and A on cellobiosaccharides and cellobiosaccharide alditols.

Table VIII Synergistic action between cellulase A and B_β in the saccharification activity^a of various substrates

Substrate ^b	Saccharification activity(mU)			Synergistic effect (%)
	A	B_β	$(A+B_\beta)/2$	
CMC	84.9	86.2	91.5	7.0
Swollen cellulose	5.2	11.4	9.7	16.9
Avicel	1.0	0.0	1.0	100.0

a, Saccharification activities were measured at 30°C for 5min.

b, Final conc. of substrate : 0.5%

第4章 考 察

本研究により得られた結果を整理すると、以下のようになる。

- 1) タツナミガイ胃歯から精製されたセルラーゼは、その等電点から、酸性成分 (A, N) と塩基性成分 (B_{β}) に区別され、 B_{β} は今日知られている最も塩基性の強いセルラーゼである。このような塩基性セルラーゼは、微生物においても発見されておらず、同一の生物から分泌されるセルラーゼ中に、酸性と塩基性の成分が存在することは、他に例が無い。
- 2) タツナミガイの胃歯から得られた3種のセルラーゼは、いずれも Endo 型であり、この起源からは、Exo 型酵素は見い出されなかった。しかし、基質に対する作用性は、各々の酵素で異なり、特に、 B_{β} のセロオリゴ糖分解様式は、今日知られている微生物セルラーゼのいずれとも異なるものであった。
- 3) A と B_{β} は、そのランダム度が大きく異なり、その相助効果は、結晶性の高い基質に対するほど大きかった。同様な相助効果は、微生物の Endo 型酵素間にも知られている。従って、タツナミガイのセルロース消化においてランダム度の違ったセルラーゼの存在する生理的意義が、微生物の場合と共通していることが判った。

このように、本研究では、同一の動物起源から幾つかのセルラーゼが単離され、従来の研究よりさらに進めて、その基質に対する作用様式が詳細に調べられた。

タツナミガイのセルラーゼ

(タツナミガイのセルラーゼ系の酵素学的研究 - I)

安斎 寛, 西沢一俊

日水誌. **48**, 1317-1322 (1982).

Purification and Characterization of a Cellulase from *Dolabella auricularia*

H. Anzai, K. Nisizawa, and K. Matsuda

J. Biochem, **96**, 1381-1390 (1984).

審 査 結 果 の 要 旨

動物界には、栄養源としてセルロースを利用できる多くの草食性動物が知られている。しかし、その消化管内の微生物に依存しない動物自身のセルロース分解能の有無に関しては、長い間論議の対象となってきたが、いまだに解明されていない。また、実際にどのようなセルラーゼが存在するかについても、ほとんど研究されていない。

本研究は、大型の藻食性軟体動物、タツナミガイ (*Dolabella auricularia*) の特殊な消化器官、胃歯 (gastric teeth) を材料としてそこに存在するセルラーゼを精製し、その酵素的性質を明らかにすることにより、その生理的意義を解明することを目的として行われた。

著者は、本研究のために新たに開発したアフィニティークロマト用吸着体をはじめとする数種のクロマトグラフィーにより、2種の精製酵素 (B_{β} , A) と1種の部分精製酵素 (N) を得、精製酵素の分子量および一般的性質を明らかにした。また、これらの酵素について等電点を調べた結果、 B_{β} は塩基性酵素、AおよびNは酸性酵素であることが判明した。特に B_{β} は今日知られているセルラーゼのなかでもっとも塩基性の強い酵素であったが、その至適 pH はいずれも消化管内の pH と一致していた。

著者はさらに、種々の基質を用いてその分解様式を検討し、どの酵素も Endo 型であることを明らかにしたが、反応速度定数や分解生成物の定量的な分離と分析により、 B_{β} が高重合度の基質に A と N が低重合度の基質に対し作用し易いことを明らかにした。

最後に著者は、これらの酵素の共同作用について検討し、 B_{β} と A の共同作用の相助効果が結晶性の高く分解され難い基質に対して大きいことを明らかにし、タツナミガイの胃歯中に含まれる基質特異性の異なる数種のセルラーゼの生理的意義が、微生物の Endo 型酵素間の共同作用の場合と共通していることを明確にした。

以上、本論文は軟体動物消化管におけるセルラーゼについて初めて詳細に検討したものでいくつもの新しい知見を含み、審査員一同著者は農学博士の学位を授与されるに十分な資格を有するものと判明した。